



**Universidad  
Zaragoza**

## Trabajo Fin de Máster

Sistemas de liberación sostenida basados en  
nanopartículas conteniendo péptidos antimicrobianos  
para el tratamiento de infecciones mediadas por  
bacterias resistentes

Sustained release systems based in nanoparticles loading  
antimicrobial peptides for the treatment of infections mediated by  
resistant bacteria

Máster Universitario en Ingeniería Biomédica

Autora

Laura D. Aguerri Fernández

Directores

Dr. Manuel Arruebo Gordo

Dra. Gracia Mendoza Cantos

Junio 2021

ESCUELA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

## Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer la oportunidad de desarrollar este trabajo a mis dos tutores. A Manuel, por estar, desde el primer momento, a plena disposición y resolver dudas una y otra vez. A Gracia, por enseñarme a ver las cosas con optimismo y a valorar mi trabajo un poco más. A los dos, por su tiempo dedicado y por lo bien que me han acogido.

También quiero dar las gracias a todas las personas que me han ayudado, tanto en el CIBA como en el INMA; a Guille por enseñarme a trabajar con bacterias, y en especial, a Cris, por resolverme dudas durante todo el año y acompañarme en mis frustraciones.

# Sistemas de liberación sostenida basados en nanopartículas conteniendo péptidos antimicrobianos para el tratamiento de infecciones mediadas por bacterias resistentes

Laura Aguerri

## Resumen

Cuando se produce una herida en la piel, nuestro cuerpo pone en marcha un mecanismo complejo de regeneración del tejido. Sin embargo, si se dan ciertas condiciones, como la existencia de una patología sistémica previa, este proceso se puede interrumpir y prolongar en el tiempo. De esa manera, la herida puede convertirse en una herida crónica. En ellas es frecuente que ocurran complicaciones, como la aparición de infecciones bacterianas. La especie bacteriana más común en infecciones de este tipo es *Staphylococcus aureus*, que posee una gran capacidad de adaptación y forma unas estructuras, denominadas biofilms, que confieren protección. Existen ya cepas de *S. aureus* resistentes a la acción de distintos antibióticos, y la OMS ha alertado de la necesidad urgente de desarrollar nuevos fármacos para tratar infecciones mediadas por este patógeno. En este contexto surge el presente trabajo. En él se ha propuesto una terapia alternativa (una proteína antimicrobiana, la lisostafina) y se ha evaluado su capacidad bactericida en experimentos con tres cepas diferentes de *S. aureus* en biofilm y sin él (cultivo planctónico). Además, para transportar la proteína hasta el sitio de acción y aportar cierto valor añadido, se ha hecho uso de la nanotecnología. Se pretendía desarrollar un sistema por el método de emulsión doble basado en nanopartículas poliméricas que contuviesen la proteína en su interior y la liberase de manera sostenida en el tiempo. Probando este sistema contra las bacterias en las mismas condiciones que la proteína libre, se podría establecer una comparativa entre la acción bactericida de la proteína libre y la de la proteína contenida en las partículas. Sin embargo, esto no fue posible debido a que durante la síntesis de los sistemas particulados surgieron distintos inconvenientes, probablemente debido al método utilizado.

# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>6</b>
1.1. Tipos de heridas . . . . .	6
1.2. Complicaciones asociadas: La infección . . . . .	7
1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> : resistencias y biofilm . . . . .	7
1.3. Los AMPs como alternativas a los antibióticos . . . . .	8
1.4. Objetivos y etapas del trabajo . . . . .	9
<b>2. Materiales</b>	<b>9</b>
2.1. Cepas bacterianas y reactivos . . . . .	9
2.2. Equipos . . . . .	10
<b>3. Métodos</b>	<b>10</b>
3.1. Elección de la proteína: la lisostafina . . . . .	10
3.2. Determinación de la actividad antimicrobiana de la proteína libre . . . . .	11
3.3. Síntesis de partículas PLGA-Lst . . . . .	12
3.4. Caracterización de las partículas . . . . .	13
3.4.1. Estimación de la concentración y el rendimiento de la reacción . . . . .	13
3.4.2. Distribución del tamaño hidrodinámico . . . . .	14
3.4.3. Determinación de la carga superficial . . . . .	14
3.4.4. Determinación de la morfología y tamaño . . . . .	14
3.5. Determinación de la cantidad de proteína encapsulada . . . . .	14
3.6. Actividad antimicrobiana de los sistemas particulados . . . . .	15
3.7. Análisis estadístico . . . . .	15
<b>4. Resultados y discusión</b>	<b>15</b>
4.1. Actividad antimicrobiana de la proteína libre . . . . .	15
4.1.1. En cultivo planctónico . . . . .	16
4.1.2. En biofilm . . . . .	16
4.2. Síntesis y caracterización de partículas PLGA-Lst . . . . .	19
4.3. Determinación de la cantidad de proteína encapsulada . . . . .	21
4.4. Actividad antimicrobiana de los sistemas particulados . . . . .	23
<b>5. Conclusiones</b>	<b>25</b>
<b>6. Líneas futuras</b>	<b>26</b>
<b>Referencias</b>	<b>27</b>
<b>Anexos</b>	<b>32</b>
Anexo I . . . . .	32
Anexo II . . . . .	35
Anexo III . . . . .	46



## Abreviaturas

<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>AMP</b>	Péptidos y/o proteínas antimicrobianas
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>C</b>	Concentración
<b>DL</b>	Drug Loading
<b>EE</b>	Eficiencia de encapsulación
<b>Lst</b>	Lisostafina
<b>MBC</b>	Concentración mínima bactericida
<b>MIC</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>MRSA</b>	<i>S. aureus</i> resistente a la meticilina
<b>MSSA</b>	<i>S. aureus</i> sensible a la meticilina
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PDI</b>	Índice de polidispersidad
<b>PLGA</b>	Ácido poli-(láctico-co-glicólico)
<b>R</b>	Rendimiento de reacción
<b>SEM</b>	Microscopía Electrónica de Barrido
<b>TSA</b>	Agar tripticasa de soja
<b>TSB</b>	Caldo tripticasa de soja
<b>UFC</b>	Unidad formadora de colonias
<b>UV-Vis</b>	Región ultravioleta-visible

# 1. Introducción

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano y su función principal es la de servir como barrera protectora frente al entorno. [1] Cuando una herida ocurre en ella se ponen en marcha mecanismos de regeneración con el objetivo de restaurar su estructura y función. [2] Así, el proceso de cicatrización de una herida es una transformación compleja, ya que está mediada por multitud de factores bioquímicos, mecánicos y ambientales muy relacionados entre ellos. [3, 4] Este proceso es dinámico y colaborativo [1, 5] dado que intervienen en él diferentes señales y tipos celulares. [6] Aunque esta transformación es continua, en general, se puede dividir en cuatro fases que, muchas veces, se solapan entre sí: [5, 7]

- **Fase de hemostasis:** Cuando se produce la herida se rompen o dañan tanto células como capilares sanguíneos que se encuentran alrededor, de manera que ocurre la extravasación o derrame de sangre por la zona. [8] Durante esta fase, también llamada *respuesta inmediata* [6], ocurren procesos que tienen como objetivo conseguir la hemostasis, interrumpiendo la hemorragia, y protegiendo el sistema vascular de la zona afectada. Por un lado, el tejido de los vasos sanguíneos implicados se contrae (vasoconstricción) para evitar el desangramiento; [5, 7] y por otro, las plaquetas se activan y agregan, formando una red con la fibrina (una proteína insoluble) que, además de taponar provisionalmente la herida formando un coágulo, sirve como andamio para el posterior desarrollo del tejido. Este tapón, formado por fibrina y plaquetas, se convertirá poco a poco en la costra. [1, 5, 6]

- **Fase de inflamación:** Tiene como finalidad limpiar la zona afectada y contener el daño en un sitio localizado. [3] Así, la zona se prepara para la posterior reparación del tejido. La región afectada se enrojece, inflama y va apareciendo la costra. Los vasos sanguíneos ahora ya se dilatan (la permeabilidad vascular aumenta) y también se activan una serie de procesos inmunológicos de defensa. [5] De ese modo, pueden llegar a la zona leucocitos (sobre todo, neutrófilos primero y macrófagos después), que son células del sistema inmune presentes en la sangre. [6] Estas células tratan de evitar que se produzca una infección, destruyendo y fagocitando bacterias, partículas extrañas y células y tejido muerto. [5] Por tanto, es una etapa crucial en el desarrollo de infecciones.

- **Fase de proliferación:** Comienza la reparación del tejido. En esta fase, células madre así como células propias del tejido conectivo, los fibroblastos, migran hacia la zona afectada y sintetizan y organizan nueva matriz extracelular, que va reemplazando la red provisional de fibrina. [5, 7] Se va formando así tejido de granulación (rico en colágeno) [4, 9] y la herida se va contrayendo (a la vez que migran células epiteliales, los límites de la herida se aproximan y se reduce su tamaño). [9] De manera simultánea se produce la regeneración de los vasos sanguíneos afectados (angiogénesis). [4, 5]

- **Fase de maduración o remodelación:** El número de células implicadas (como macrófagos o fibroblastos) disminuye, el tejido de la herida madura y se forma la cicatriz. [4, 7, 10] Las fibras de colágeno se reorganizan y remodelan, aportando resistencia al tejido. Con el paso del tiempo la resistencia del tejido de la cicatriz alcanza un máximo, siempre menor al del tejido sano que reemplaza (en torno al 70-80 %). [7, 11]

## 1.1. Tipos de heridas

Las heridas se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios. [12] Según el tiempo que tardan en curar, las heridas pueden ser agudas o **crónicas**. [4, 5] En las heridas agudas la reparación del tejido ocurre de manera normal y ordenada (como se ha descrito anteriormente), y suele

completarse en un periodo de tiempo menor a 30 días. [5, 7] Sin embargo, dada la complejidad del proceso, éste no siempre ocurre de esa manera. Así, las heridas crónicas son aquellas en las que se produce la interrupción o el fallo de uno o varios procesos implicados en la regeneración del tejido o de su función. Como resultado, requieren un largo periodo de tiempo para curarse<sup>1</sup>. En los peores casos puede no llegar a conseguirse nunca. [2, 3, 7]

Mientras que las heridas agudas suelen ser consecuencia de traumatismos o intervenciones quirúrgicas, las heridas crónicas están asociadas en la mayoría de los casos a otras patologías, locales o sistémicas, que dificultan la normal recuperación del tejido. [3, 5, 13] Entre las más comunes se encuentran las úlceras de pie en el caso de pacientes diabéticos, las úlceras venosas asociadas a trastornos vasculares o las úlceras de presión o decúbito, que surgen tras una presión prolongada en la piel. [14] Las heridas crónicas no sólo suponen un riesgo para el paciente y su calidad de vida sino que también representan un reto para los sistemas de salud y la economía de todo el mundo. [13, 15] Al coste del propio tratamiento se le suman los cuidados de enfermería e incluso, a veces, la estancia hospitalaria. Además, hasta la fecha tan solo han sido aprobadas por la FDA cuatro terapias para el tratamiento de este tipo de heridas en la piel (Dermagraft, Graftskin e Integra, como sustitutos dérmicos, y rhPDGF, basada en factores de crecimiento). [16–20] Por todo ello urge la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para solventar este problema.

## 1.2. Complicaciones asociadas: La infección

La dificultad para tratar las heridas crónicas muchas veces no radica en la propia herida, sino en la patología principal de los pacientes y en las complicaciones que pueden surgir en el proceso de curación. De entre estas últimas las **infecciones bacterianas** son una de las más frecuentes y pueden suponer la interrupción del proceso de regeneración. [21]

La piel es la primera línea de defensa frente a la entrada de agentes externos. Si se daña, capas más internas del tejido quedan expuestas y bacterias provenientes del ambiente o de otras áreas de piel sana pueden acudir. Sin embargo, la mera presencia de bacterias en una herida no implica que haya infección. Para que ésta ocurra, se debe sobrepasar un límite crítico ( $10^5$  bacterias/gramo tejido) en el que la densidad de bacterias, que se van reproduciendo continuamente, es lo suficientemente alta para invadir capas más internas del tejido, tomando el control de la zona. [14, 21] Si la infección no remite, puede acabar extendiéndose por todo el cuerpo.

### 1.2.1. *Staphylococcus aureus*: resistencias y biofilm

En las heridas crónicas es común que convivan varias especies bacterianas. [22] Aunque suelen predominar bacterias del género *Staphylococcus*, también es frecuente encontrar otros como *Enterococcus* o *Pseudomonas*. [22–24] De entre los primeros, ***Staphylococcus aureus*** es el patógeno más frecuente en heridas crónicas infectadas. [25] Asimismo, esta especie bacteriana está asociada a muchas otras infecciones en humanos, como el impétigo (infección en la piel común en niños), bacteremia (infección de la sangre), o aquellas llamadas nosocomiales (adquiridas en los hospitales). [26–28] También es una fuente frecuente de infecciones asociadas a implantes o prótesis. [29, 30] En la lista de patógenos prioritarios que precisan del desarrollo de nuevos tratamientos para combatirlos que la OMS publicó en 2017, *S. aureus* cuenta con una prioridad alta debido a la existencia de cepas de esta especie resistentes a antibióticos convencionales como la metilicina o la vancomicina. [31] Entre las causas de su patogenicidad destaca la capacidad de este organismo de adaptarse a diferentes ambientes y a formar estructuras denominadas biofilms, que hacen más difícil su eliminación.

---

<sup>1</sup>Algunos autores exponen que es de 4-6 semanas, pero no hay un consenso claro al respecto.

En general, las bacterias pueden crecer en dos formas distintas: en estado **planctónico** y en **biofilm**. En el primero, las bacterias se encuentran suspendidas en el medio, flotando sin adherirse a superficies, y es el tipo de crecimiento más común ensayado en los laboratorios. Sin embargo, en la naturaleza es más frecuente que ocurra el biofilm. Se trata de una estructura densa y heterogénea en la que varias poblaciones de bacterias conviven y están rodeadas de una matriz muy hidratada que les permite unirse a otras superficies tanto orgánicas como inertes. [32] Además, estas estructuras confieren protección, sirviendo como barrera física y reduciendo la difusión de compuestos tóxicos entre el medio externo y el biofilm. De hecho, se ha visto que las bacterias presentes en los biofilms son de 100 a 1000 veces menos sensibles a los antibióticos que las que crecen de manera planctónica. [33] En el caso de las heridas crónicas, la prevalencia de los biofilms en ellas es del 78 %, según una revisión sistemática combinada con un metaanálisis publicada en 2017. [34] Además, la existencia de biofilms de *S. aureus* se ha relacionado con deficiencias en la formación de tejido de granulación, [35] interrumpiendo el proceso de curación de la herida y contribuyendo a su cronicidad.

### 1.3. Los AMPs como alternativas a los antibióticos

Dado que los métodos convencionales para tratar infecciones en la piel implican el uso de antibióticos tópicos que muchas veces no son del todo efectivos y propician la aparición de resistencias, es preciso desarrollar terapias alternativas que reduzcan su uso.

En la actualidad, una de las líneas de estudio es el uso de **proteínas y péptidos con propiedades antimicrobianas (AMPs)**. Los AMPs se encuentran en infinidad de organismos, como animales, plantas o bacterias, y forman parte de mecanismos propios de defensa. [36,37]. Actúan en concentraciones muy bajas, de manera rápida y directa, y suelen hacerlo sobre la membrana del agente microbiano. [38,39] Se ha sugerido que su modo de acción se basa en ataques simultáneos sobre diferentes dianas de la membrana, lo que se traduce en una rara probabilidad de provocar resistencias. [38–40] Además de ser potentes, pueden tener actividad inmunomoduladora, activando procesos como la migración celular que tratan de eliminar los microorganismos causantes de la infección. [36] Diversos estudios indican también que pueden ayudar en procesos como la síntesis de colágeno o la angiogénesis. [41–43]. Sin embargo, su uso directo en formulaciones tópicas parece estar limitado debido a una baja estabilidad y actividad en el entorno de la herida y problemas de toxicidad. [40,44] Es por ello que desarrollar sistemas seguros que sirvan de vehículo o confieran protección a los AMPs sin dañarlos y manteniendo su actividad es esencial.

En este estudio se pretende desarrollar un sistema nanoestructurado basado en la liberación sostenida en el tiempo de un AMP como agente terapéutico para tratar infecciones mediadas por bacterias. En concreto, se trata de partículas poliméricas que contienen una proteína antimicrobiana, la **lisostafina**, dispersa en su interior. La lisostafina actúa específicamente contra *S. aureus*, en concentraciones similares a las de los antibióticos ( $\mu\text{g/mL}$ ) y se ha utilizado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. [45,46] Se ha ensayado en planctónico y en biofilms, y también ha mostrado una actividad sinérgica en combinación con antibióticos. [47,48] El polímero utilizado es **ácido poli(láctico-co-glicólico)** (PLGA) que, en condiciones fisiológicas, sufre hidrólisis y se degrada en compuestos metabolizables por el organismo (ácido láctico y ácido glicólico). Además de transportar el fármaco al sitio de acción, la degradabilidad del PLGA (fácilmente modificable variando parámetros como la composición de cada polímero), convierte al sistema en uno de liberación sostenida. Es decir, el activo terapéutico (lisostafina) se va liberando conforme el polímero se degrada, de manera que se consigue una acción prolongada en el tiempo. Incorporando este tipo de sistemas en forma de cremas o en apósitos se podría conseguir disminuir el número de aplicaciones necesarias, aumentar la disponibilidad y seguridad del agente terapéutico y mejorar así la calidad de vida del paciente a la vez que se disminuye el uso de

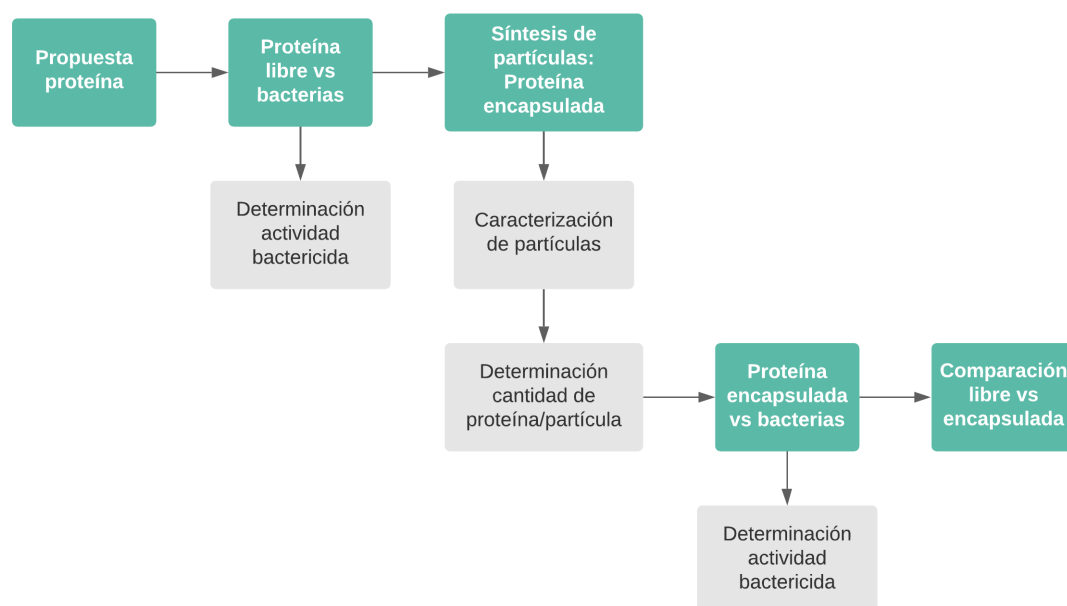
antibióticos.

## 1.4. Objetivos y etapas del trabajo

En cuanto a los **objetivos académicos**, el presente trabajo pretende aunar los conocimientos adquiridos durante el máster y aplicarlos a una cuestión real, como es la comprensión del problema biomédico de las heridas crónicas cutáneas, tratando a su vez de diseñar una estrategia nanoterapéutica para combatirlo.

Entre los **objetivos específicos** del trabajo se encuentran, por un lado, la búsqueda de una terapia biológica (proteína) comercial con acción bactericida (en este caso, la lisostafina). Una vez propuesta la terapia se quiere determinar su acción antimicrobiana frente a tres cepas bacterianas de *S. aureus*. Una de ellas está modificada genéticamente para que exprese una proteína fluorescente (*S. aureus* GFP), mientras que las otras dos son cepas clínicas: una sensible a la meticilina (MSSA) y otra resistente a ella (MRSA); *S. aureus* Newman y USA 300 respectivamente. El siguiente objetivo es sintetizar partículas poliméricas por la técnica de emulsión doble que contengan la proteína en su interior y sirvan de vehículo para la misma a la vez que se consigue una liberación sostenida en el tiempo. Una vez sintetizadas y caracterizadas estas partículas, se pretende probarlas frente a las tres cepas bacterianas para poder comparar su efecto antimicrobiano con el de la proteína sin encapsular.

Las diferentes etapas del trabajo quedan representadas en el siguiente diagrama de flujo:



**Figura 1:** Etapas (verde) y subetapas (gris) del trabajo.

## 2. Materiales

### 2.1. Cepas bacterianas y reactivos

En este estudio se utilizaron tres cepas bacterianas (*S. aureus* GFP, *S. aureus* Newman y *S. aureus* USA300), todas ellas cedidas por la Dra Cristina Prat (IGPT, Badalona). Los medios de cultivo, Trypticasein Soy Agar (TSA) y Trypticasein Soy Broth (TSB), pertenecen a

la casa comercial CondaLaB, y el tampon fosfato salino Dubelcco (PBS) pertenece a Biowest. La lisostafina y el blanco de calcoflúor fueron adquiridos en Sigma. De la proteína se adquirieron 2 lotes diferentes (ver Anexo I). La dilución de uno de ellos fue realizada en buffer ácido (pH 4.2) preparado a partir de ácido acético (99,8 %, Acros Organics) y acetato de sodio (99,0 %, Sigma). El otro lote fue disuelto en una mezcla de PBS y agua ultrapura (mili-Q). Para la síntesis de partículas se utilizó ácido poli(láctico-co-glicólico) (Resomer®RG 504, Evonik; ratio 50:50 (L:G)), acetato de etilo (99.6 %, Acros Organics) en la fase orgánica, PBS para la fase acuosa y colato de sodio hidratado (99 %, Alfa Aesar) como surfactante.

## 2.2. Equipos

En los experimentos con bacterias se utilizó un contador de bacterias (*Synbiosis*), una estufa y un microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX 81). En la síntesis de NPs se utilizó, un sonicador digital de dedo (Branson) a 450W de potencia, una centrífuga (Megafuge 16R, Thermo Scientific) y una placa de agitación (2mag). Para la caracterización de las partículas se utilizó una ultramicrobalanza (MIA 5/2Y, Radwag), un equipo de dispersión dinámica de la luz (90Plus, Brookhaven) y un espectrofotómetro (V-670, Jasco). También se utilizó un microscópico electrónico de barrido (Inspect-F50, FEI) del Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA). Para el ensayo de la BCA se utilizó un espectrofotómetro para placas de microtitulación (Odyssey CLx, LI-COR Biosciences).

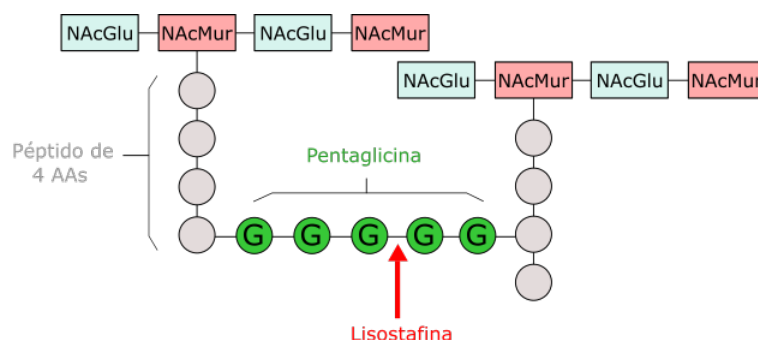
## 3. Métodos

### 3.1. Elección de la proteína: la lisostafina

Inicialmente se realizó una búsqueda bibliográfica de AMPs que fueran activos frente a *S. aureus* y se propusieron algunos AMPs como CF-301, gp144 o LysK; pero se descartaron por no encontrarse disponibles comercialmente. La búsqueda continuó hasta encontrar la lisostafina, disponible en varias casas comerciales y con propiedades antiestafilocócicas. Además de lo comentado sobre ella en el apartado 1.3, también se encontró otra información que la hacía muy atractiva. Por un lado, la resistencia a la lisostafina está muy poco reportada. Además, se ha visto que la adquisición de resistencia hacia ella está asociada con una pérdida de resistencia (mayor sensibilidad) a los antibióticos del tipo  $\beta$ -lactámicos, los más usados. [49] Asimismo se ha utilizado en materiales de distinta naturaleza. Prueba de ello es la síntesis de fibras de celulosa conteniendo la proteína, que presentan buena biocompatibilidad y actividad antimicrobiana en un modelo de piel infectada con *S. aureus*. [50] También se ha utilizado con éxito en recubrimientos de implantes de titanio para prevenir la inflamación de los huesos asociada a infecciones. [51] Hasta la fecha, sólo se ha encontrado una referencia de su uso en partículas sintetizadas por emulsión doble, [52] por lo que su uso en este estudio resulta más atractivo y ambicioso. En cuanto a las desventajas para su utilización destaca su coste, relativamente alto.

En cuanto a su clasificación, la lisostafina pertenece al grupo de las bacteriocinas. De manera sencilla esto implica que es secretada como mecanismo de supervivencia por unas bacterias con el fin de inhibir el crecimiento o la acción de otras. En concreto, la lisostafina es secretada y liberada al exterior por *Staphylococcus simulans*, y su actividad es específica frente a otras bacterias de su género (*Staphylococcus*). En cuanto a sus propiedades moleculares, se trata de una metaloenzima (contiene zinc), de 27kDa de masa molecular y compuesta por 246 aminoácidos. Su modo de acción se basa en adherirse y romper o lisar la pared bacteriana, [53] cuyo componente principal es el peptidoglicano. El peptidoglicano es un copolímero formado por residuos alternantes de N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. En el caso de *S. aureus*, el N-acetilmurámico, a su vez, se une a un péptido de cuatro aminoácidos, conectados entre sí mediante pentaglicinas (péptido formado por 5 aminoácidos glicina unidos linealmente). Parece ser que la lisostafina se

une a las glicinas y actúa específicamente rompiendo el enlace entre la tercera y la cuarta (ver Fig. 2), hidrolizando así la pared bacteriana.



**Figura 2:** Modo de acción de la lisostafina sobre la pared bacteriana. Ésta se une específicamente entre la tercera y la cuarta glicina (G) y rompe el enlace que las une. De esa manera, la pared bacteriana se destruye. Adaptada de [54].

### 3.2. Determinación de la actividad antimicrobiana de la proteína libre

Previamente a la síntesis de partículas se quiso comprobar la acción bactericida de la proteína libre. Para ello, se utilizó un procedimiento de microdilución en caldo, que es el método de referencia para comprobar la susceptibilidad antimicrobiana y sirve para determinar la **concentración mínima inhibitoria (MIC)**. La MIC se refiere a la concentración más baja del agente microbiano (en nuestro caso, la lisostafina) que impide el crecimiento bacteriano en las condiciones ensayadas. [55] Ésta se asume cuando las muestras incubadas con la proteína presentan una reducción en la población bacteriana de en torno a 2 logaritmos decimales (o mayor) con respecto al control (sin proteína). En este ensayo también se determinó la **concentración mínima bactericida (MBC)**, que se describe como la concentración más baja que produce la muerte total de la población bacteriana inicial.

La actividad antimicrobiana de la lisostafina se evaluó tanto para el cultivo planctónico como para el biofilm (antes y después de formarlo). Para la determinación de ambas concentraciones (MIC y MBC) se realizaron experimentos con cada una de las cepas por separado (un mínimo de 3 veces cada experimento). En cada uno de ellos se preparaban 2 muestras independientes a cada concentración de proteína que se quería probar (además del control sin proteína). Por cada muestra se obtenían finalmente tres resultados expresados como **Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL**.

El primer paso en todos ellos fue la preparación del inóculo (suspensión de bacterias (20  $\mu$ L en 4 mL de caldo de cultivo TSB) que se incubó en condiciones de crecimiento (16h, 37°C) y agitación. Pasado ese tiempo, se comprobó que habían crecido de manera correcta (por medidas de densidad óptica) y se continuó con el experimento:

- **Cultivo planctónico:** La concentración del inóculo se ajustó con TSB a  $10^5$  UFC/mL y se utilizó para preparar las muestras. Cada una de ellas estaba formada por una concentración distinta de proteína en un volumen final de 1 mL de muestra. Tras su preparación, las muestras se incubaron (24h, 37°C, agitación). Pasado ese tiempo, se realizaron diluciones seriadas de cada una de ellas en PBS y se sembraron (3 alícuotas distintas de 25  $\mu$ L por cada muestra) en agar nutritivo (placas de Petri con TSA). Las placas de TSA inoculadas se incubaron en la estufa (37°C) toda la noche en estático y al día siguiente se contaron

las colonias que habían crecido en cada una de las alícuotas sembradas y se calcularon las UFC/mL. Así, se obtienen 3 resultados de UFC/mL por cada muestra.

- **Cultivo en biofilm:** Se desarrolló acorde al método utilizado anteriormente en el grupo. [56] En ambos experimentos la concentración del inóculo inicial se ajustaba a  $10^7$  UFC/mL.
  - **Antes de formarlo:** Las muestras se prepararon a partir del inóculo de manera similar al cultivo planctónico (concentraciones crecientes de proteína y volumen final de 1mL en TSB). De cada muestra se adicionaron 100  $\mu$ L a un pocillo distinto de una placa de microtitulación y se incubaron toda la noche (37°C) en estático para permitir la formación del biofilm. Al día siguiente, el medio líquido presente se retiró de las placas y se realizaron dos lavados con PBS para retirar las bacterias en suspensión y restos de proteína presentes. Tras los lavados, el biofilm se rompió (baño sonicador, 15 min, 200W) y se realizaron diluciones seriadas de las muestras en PBS, se sembraron en placas de TSA y se incubaron. Al día siguiente se contaron las colonias de cada alícuota y se calcularon las UFC/mL correspondientes.
  - **Después de formarlo:** Se adicionaron 100  $\mu$ L del inóculo inicial a cada pocillo de la placa de microtitulación y ésta se incubó durante 24h. De esta forma, el biofilm se formaba en el fondo del pocillo. Al día siguiente, se retiró el medio líquido sobrante y los pocillos se lavaron dos veces con PBS. A su vez, se prepararon disoluciones de la proteína en TSB a distintas concentraciones y se adicionaron 100  $\mu$ L de cada una a los distintos pocillos con el biofilm ya formado. La placa se incubó toda la noche y al día siguiente se retiró el medio líquido sobrante y se lavó con PBS. El biofilm se rompió (baño sonicador, 15 min, 200W) y las muestras se diluyeron, sembraron e incubaron. Al día siguiente se contaron las colonias y se calcularon las UFC/mL.

Asimismo, se quiso comprobar cómo se formaba el biofilm mediante microscopía de fluorescencia. Para visualizarlo, se realizó una tinción con blanco de calcoclúor, un compuesto que tiñe de azul fluorescente la matriz extracelular del biofilm. El biofilm se formó en el fondo de los pocillos de la placa, se añadió el compuesto y se incubó en la oscuridad (1 min, temperatura ambiente). Después, los restos del tinte se desecharon y se lavaron los pocillos dos veces con PBS. Se dejaron secar y se observaron con el microscopio de fluorescencia invertido. Se pueden ver imágenes del biofilm de las tres cepas en el Anexo II.

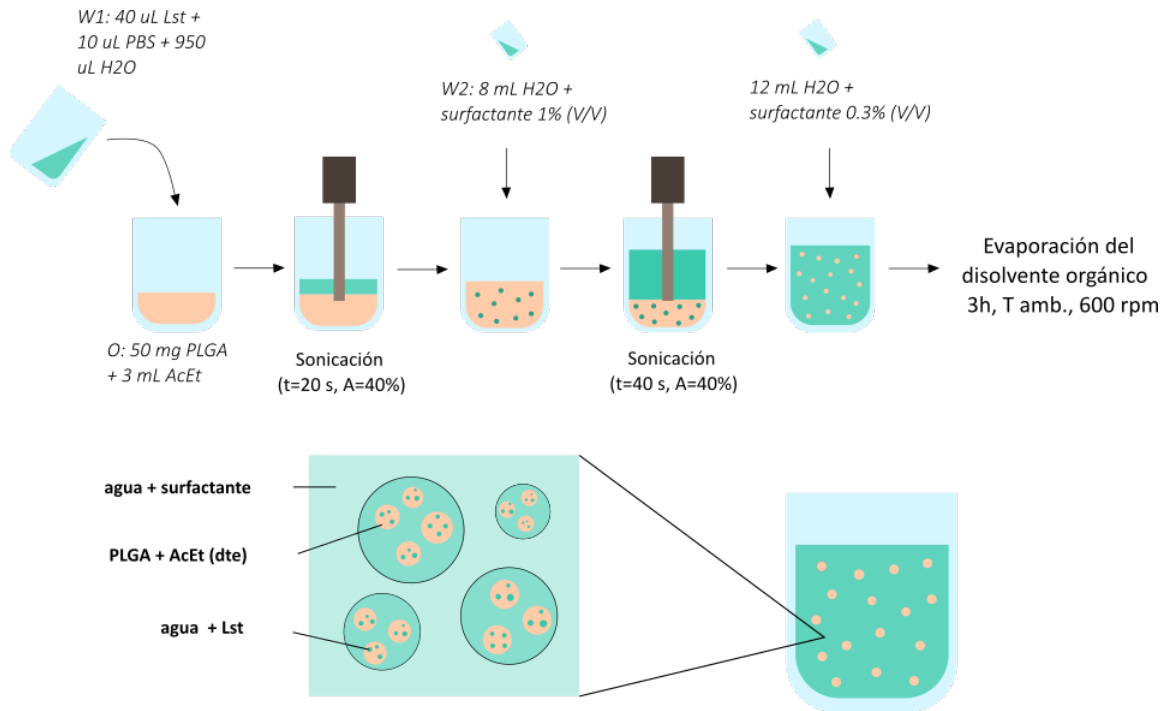
### 3.3. Síntesis de partículas PLGA-Lst

En este apartado se detalla el protocolo final de la síntesis realizado para formar las partículas. Se trata de una adaptación de un método anterior desarrollado en el grupo. [57] Las distintas pruebas realizadas hasta llegar a él se detallan en el apartado 4.2 y en el Anexo II.

La síntesis de nanopartículas se llevó a cabo mediante el método de **emulsión doble** *water-oil-water* (W1/O/W2) seguida de la evaporación del disolvente orgánico. En un primer paso, el polímero es disuelto en una fase orgánica (*oil*; O) y la proteína se disuelve en una fase acuosa de menor volumen (*water*; W1). Ambas fases se ponen en contacto en un mismo recipiente y se aplica una fuerza mecánica (en nuestro caso, por ultrasonidos a través de un sonicador de dedo) necesaria para formar la emulsión. Así, una primera emulsión *water-in-oil* (W1/O) se forma. Esta primera emulsión se pone en contacto con otra fase acuosa (W2), y también se somete a sonicación para formar finalmente la emulsión doble W1/O/W2. El disolvente orgánico es volátil y ligeramente miscible con la fase acuosa externa. De esta forma, en contacto con ella a temperatura ambiente y agitación magnética, el disolvente orgánico difunde lentamente hacia el exterior y se evapora. Tras un tiempo prolongado en constante agitación (3h), todo el disolvente orgánico ha salido al exterior y se ha evaporado. Sin embargo, el polímero que contenía, incapaz de solubilizarse en un entorno acuoso, no lo ha hecho y precipita en forma de partículas



que contienen la proteína en su interior. Además, durante la síntesis se adiciona un surfactante (colato de sodio), con el fin de estabilizar la dispersión y evitar que las partículas se aglomeren. La Fig.3 recoge el proceso de síntesis de las partículas.



**Figura 3:** Esquema del protocolo de síntesis por el método de emulsión doble. Tras la evaporación del disolvente orgánico, las muestras se lavaron y se redispersaron en agua.

Tras la evaporación, las partículas se someten a dos ciclos de centrifugación o lavados, de manera que se separan de los restos de polímero y surfactante que pueda haber en la disolución.

### 3.4. Caracterización de las partículas

Una vez obtenidas las muestras se llevó a cabo su caracterización. El primer paso consta de una inspección visual para observar si aparecen o no precipitados. Si la muestra se puede redispersar correctamente, se lleva a cabo una caracterización físico-química realizando diversas pruebas:

#### 3.4.1. Estimación de la concentración y el rendimiento de la reacción

La **concentración (C)** de las partículas se determinó por diferencia de pesada. Un volumen conocido (30  $\mu$ L) de las muestras se adicionaba a pocillos previamente pesados y se calentaban (80°C) hasta la evaporación del agua. Entonces se pesaban de nuevo los pocillos, que contenían solamente ya las partículas. Teniendo en cuenta la diferencia entre las pesadas y el volumen de muestra adicionado, se calculaba la concentración según:

$$C(m/V) = \frac{\text{masa pocillo lleno} - \text{masa pocillo vacío}}{\text{volumen dispersión adicionado}} \quad (1)$$

El **rendimiento de reacción (R)** es el porcentaje de masa obtenido (masa de las partículas) con respecto a la adicionada inicialmente (polímero + proteína) según:

$$R(\%) = \frac{\text{masa total NPs}}{\text{masa PLGA} + \text{masa Lst}} \cdot 100 \quad (2)$$

### 3.4.2. Distribución del tamaño hidrodinámico

Hace referencia al tamaño de la esfera de hidratación, es decir, al de la partícula y los iones que quedan adheridos a la misma cuando se encuentra en dispersión. Se trata de una propiedad clave a la hora de formular fármacos o terapias ya que informa del tamaño de las partículas en el medio en el que se van a usar.

Se utilizó para ello la técnica de dispersión dinámica de luz (*Dinamic Light Scattering; DLS*). En ella una luz láser es dispersada al atravesar la muestra debido al movimiento browniano de las partículas. Se trata del movimiento aleatorio de las mismas al difundir en el disolvente. Aquellas más pequeñas se mueven y chocan con las moléculas del disolvente mucho más rápido, mientras que las partículas más grandes lo hacen de manera más lenta. Así, según el tamaño de las partículas, la luz se dispersa de manera diferente. Con un detector apropiado se recogen los patrones de dispersión y se pueden correlacionar con el tamaño hidrodinámico, obteniendo así el diámetro y distribución (a través del índice de polidispersidad) de las partículas.

### 3.4.3. Determinación de la carga superficial

La carga superficial de las partículas en la muestra da información acerca de su estabilidad en el medio. Esta propiedad se puede cuantificar a través de la medida del potencial Z, una magnitud que expresa la atracción o repulsión electrostática de las partículas. Para su determinación se utilizó la técnica de dispersión de luz electroforética, que aplica un campo eléctrico a la muestra y relaciona la movilidad de las partículas presentes con su carga.

### 3.4.4. Determinación de la morfología y tamaño

Se determinó usando un microscopio electrónico de barrido (SEM). Las muestras se prepararon adicionando una gota sobre un cubreobjetos de vidrio pegado a un portaobjetos y se dejaron secar. Se llevaron al servicio de Microscopías Avanzadas y allí se recubrieron de un material conductor eléctrico (Pd), observaron y tomaron las imágenes. Posteriormente éstas fueron analizadas con el software ImageJ (NIH) para obtener una distribución de tamaños.

## 3.5. Determinación de la cantidad de proteína encapsulada

La cuantificación de la cantidad de proteína encapsulada se llevó a cabo mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA), [58] utilizando para ello el kit de ensayo BCA Pierce (Thermo Scientific). Se trata de un kit rápido que determina la cantidad total de proteína que hay en una muestra al medir un cambio de color en ella. El fundamento del kit se basa en que las proteínas en medio básico son capaces de reducir los iones  $\text{Cu}^{2+}$  presentes a  $\text{Cu}^{+}$ . Si en el medio, además, hay BCA, se forma un complejo de color morado con los iones  $\text{Cu}^{+}$ , con un máximo de absorbancia a 562nm. Como el número de iones  $\text{Cu}^{+}$  que se producen (y, por tanto, la cantidad de complejo morado) está directamente relacionado con la cantidad de proteína presente, es posible cuantificarla. Para ello, con el kit primero se realiza una recta de calibrado de la absorbancia de disoluciones de concentración conocida de una proteína modelo (*Bovine Serum Albumin*, BSA) y luego se interpolan las medidas de absorbancia de muestras desconocidas. En éstas últimas, los cambios de absorbancia respecto al blanco de la recta estarán directamente relacionados con la cantidad de lisostafina presente. Para más información acerca del *kit*, se recomienda visitar el Anexo II.

Con los resultados del ensayo de la BCA se pudo determinar de manera indirecta tanto la **Eficiencia de Encapsulación (EE)** como el **Drug Loading (DL)** utilizando las Ec. (3) y (4). La EE hace referencia al porcentaje de proteína que se logra encapsular con respecto al total

de proteína añadida, mientras que el DL es el porcentaje de proteína encapsulada con respecto a la masa total de las partículas.

$$EE(\%) = \frac{\text{masa de Lst encapsulada}}{\text{masa de Lst añadida}} \cdot 100 \quad (3)$$

$$DL(\%) = \frac{\text{masa de Lst encapsulada}}{\text{masa total de NPs}} \cdot 100 \quad (4)$$

### 3.6. Actividad antimicrobiana de los sistemas particulados

El objetivo final de este trabajo era conocer la actividad antimicrobiana de las partículas sintetizadas y compararla con la actividad de la proteína libre. Lo que se pretendía, pues, era someter a las bacterias a las partículas cargadas, de las que se conocería el perfil de liberación, y ver si ejercían una actividad antimicrobiana sostenida en el tiempo. Sin embargo, como se explica más adelante (apartado 4.4) esto no resultó posible.

De manera alternativa, se decidió realizar 3 síntesis diferentes de partículas PLGA-Lst y someterlas a condiciones de liberación (37°C, agitación) durante diferentes tiempos (24h, 48h y 6 días). Estas condiciones implican una degradación del PLGA que compone las partículas, liberando así su contenido al medio exterior. Se realizaron ensayos indirectos para determinar la cantidad de la proteína encapsulada y, además, se formuló la hipótesis de que a las 24h se habría liberado el 100 % de lo contenido. De esta forma, enfrentando las bacterias con una cantidad conocida de este medio, podríamos observar su actividad antimicrobiana y estimar cómo se habría llevado a cabo en realidad la liberación. Este experimento sólo se realizó con una cepa bacteriana (*S. aureus* Newman) y en cultivo planctónico, siguiendo el protocolo ya explicado en el apartado 3.2.

### 3.7. Análisis estadístico

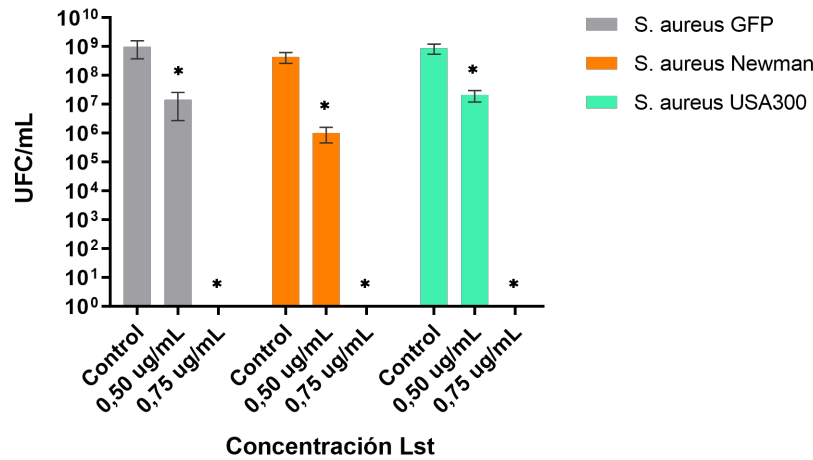
Para el análisis estadístico de los resultados del crecimiento bacteriano (UFC/mL) se utilizó el software GraphPad Prism. Con él se realizó un ANOVA de un factor ( $p < 0,05$ ; siendo el factor la concentración de proteína) para determinar si las medias de las UFC/mL a cada concentración diferían significativamente respecto a la media UFC/mL control). El número de observaciones (resultados analizados) a cada concentración fue de  $N=12$ . En el Anexo III se encuentran los ficheros de salida del análisis.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Actividad antimicrobiana de la proteína libre

En lo sucesivo se muestran las gráficas que resumen los datos de crecimiento bacteriano (UFC/mL) obtenidos a partir de los experimentos realizados al enfrentar la proteína libre frente a cada una de las cepas bacterianas.

#### 4.1.1. En cultivo planctónico



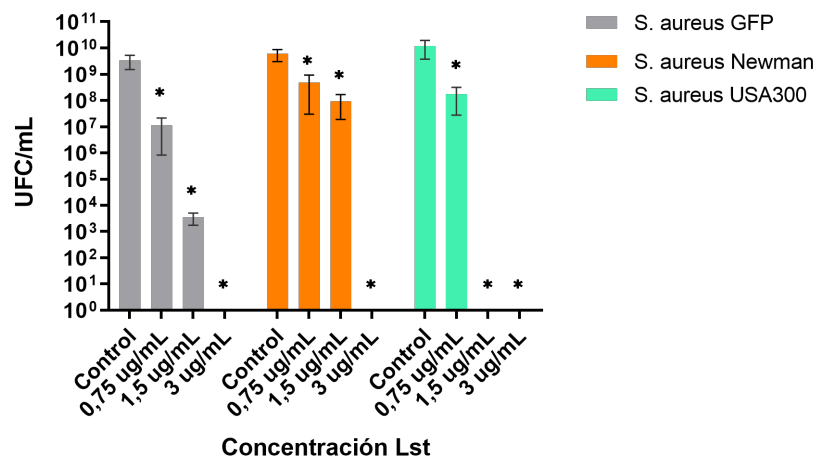
**Figura 4:** Resultados de los ensayos en cultivo planctónico representados como la UFC/mL media  $\pm$  SD (N=12). \*Significativamente diferentes con respecto a la media control ( $p < 0.05$ ).

Como era de esperar, se observa cómo a mayor concentración de proteína el crecimiento bacteriano es menor. Además, el comportamiento de las tres cepas frente a la proteína en cultivo planctónico es muy similar. En todas ellas se encontró que la concentración mínima inhibitoria fue de  $0.50 \mu\text{g/mL}$  de lisostafina, mientras que la concentración bactericida mínima fue  $0.75 \mu\text{g/mL}$ .

#### 4.1.2. En biofilm

Se muestran los resultados de la acción del compuesto sobre el crecimiento bacteriano antes y después de formar el biofilm.

##### • Antes de formar el biofilm:



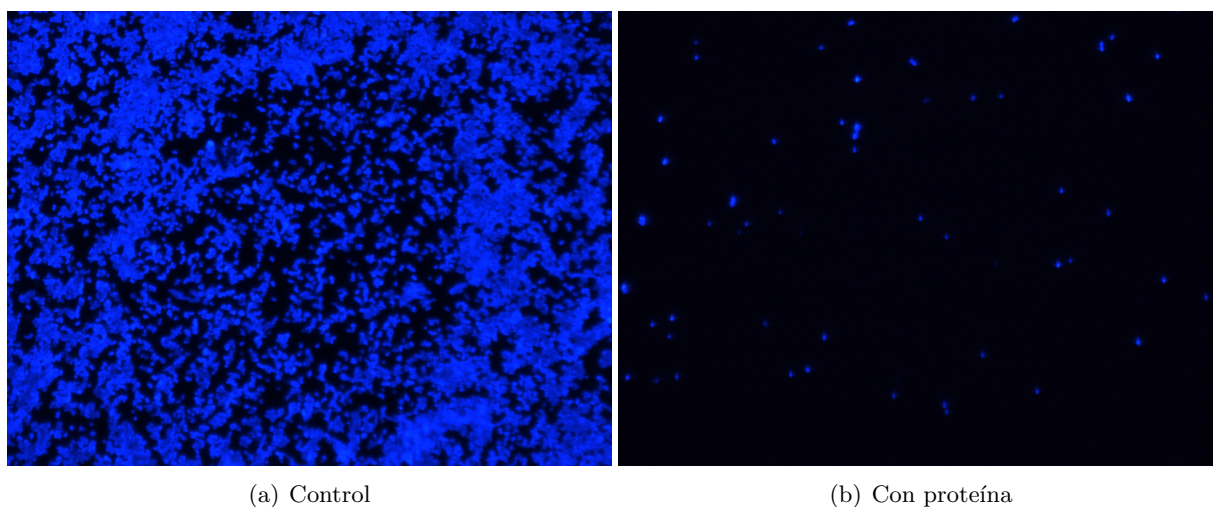
**Figura 5:** Resultados de los ensayos al añadir la proteína previamente a la formación del biofilm representados como la UFC/mL media  $\pm$  SD (N=12). \*Significativamente diferentes con respecto a la media control ( $p < 0.05$ ).

En el caso de la acción de la lisostafina antes de formar el biofilm es posible confirmar que, en todas las cepas estudiadas, ejerce una reducción en su formación, llegando incluso a prevenir totalmente su formación. Además, al igual que ocurría con el cultivo planctónico, se observa cómo a mayor concentración de proteína, menor es el crecimiento bacteriano. Aunque las tres cepas no presentan exactamente el mismo comportamiento, sí que muestran una tendencia similar. En todas ellas la concentración necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano fue mayor que en el caso del planctónico, como se podría esperar debido a la protección que ejerce la estructura del biofilm. En la siguiente tabla se resumen los valores de MIC y MBC para las distintas bacterias:

**Tabla 1:** Concentraciones mínimas inhibitoria (MIC) y bactericida (MBC) encontradas para cada cepa antes de formar el biofilm.

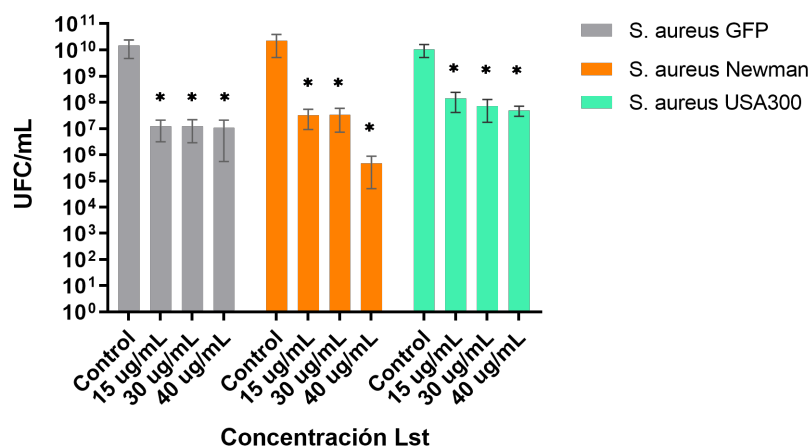
<i>S. aureus</i>	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	MBC ( $\mu\text{g/mL}$ )
GFP	0,75	3,00
Newman	1,50	3,00
USA300	0,75	1,50

Asimismo, también se quiso visualizar la acción que ejerce el compuesto en la formación del biofilm examinándolo en el microscopio de fluorescencia invertido tras la tinción con blanco de calcoflúor. Las imágenes que se muestran a continuación (Fig. 6) permiten observar la reducción en el biofilm a la concentración inhibitoria mínima de lisostafina.



**Figura 6:** Imágenes de fluorescencia (40x) del biofilm de *S. aureus* Newman formado sin añadir proteína (a) y tras añadirla ( $1,50 \mu\text{g/mL}$ ) (b).

- Después de formar el biofilm:



**Figura 7:** Resultados de los ensayos al añadir la proteína después de la formación del biofilm representados como la UFC/mL media  $\pm$  SD (N=12). \*Significativamente diferentes con respecto a la media control ( $p < 0,05$ ).

Como se observa en la Fig. 7, el comportamiento de las bacterias al añadir el compuesto una vez formado el biofilm difiere de los anteriores. La proteína sí que consigue inhibir el crecimiento celular pero para las concentraciones probadas no ejerce una actividad bactericida tal que elimine la totalidad del biofilm. Esto se puede explicar debido a que, cuando existe lisostafina en el medio, ésta ejercerá su poder bactericida, y es probable que el biofilm no se forme de manera íntegra en algunas zonas. Sin embargo, si el biofilm ya ha sido preformado, existe una fuerte barrera física que confiere protección antes de adicionar la proteína, por lo que su efecto se ve limitado. En este caso también se observa que, una vez alcanzada la MIC, no se aprecia una reducción en el crecimiento bacteriano a mayor concentración de proteína, salvo para el caso de *S. aureus* Newman. La MIC encontrada fue de 15 ug/mL para las tres cepas.

Hasta la fecha no se han encontrado en la literatura estudios que comparen la acción de la lisostafina en los tres cultivos diferentes (planctónico, antes y después de formar el biofilm), por lo que sólo se van a exponer algunos ejemplos de referencias encontradas que ayuden a ejemplificar la coherencia de los resultados arriba expuestos. En 2005 se publicó un estudio realizado con 13 cepas de *S. aureus* a las que se les añadió distintas concentraciones de lisostafina tanto en cultivo planctónico como en biofilm preformado. Para el cultivo planctónico, la MIC determinada variaba entre 0,125-0,500  $\mu\text{g/mL}$ , con una excepción de 0,063  $\mu\text{g/mL}$  y otra de 32  $\mu\text{g/mL}$ . Para el biofilm preformado, en más de la mitad de las cepas probadas la MIC se encontraba entre 4-32  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que en el resto de las cepas, se excedía la máxima concentración de lisostafina probada (64  $\mu\text{g/mL}$ ). [59] Otro estudio comparaba la acción de la proteína frente a distintas cepas de *S. aureus* en planctónico (con una MIC de 0,002-32  $\mu\text{g/mL}$ ) y en biofilms formados en superficies de distintos materiales (poliestireno, policarbonato y vidrio; MIC entre 1-50  $\mu\text{g/mL}$ ). [60] En otra investigación determinaron la MIC de lisostafina para varias cepas de *S. aureus* en 3,9-50  $\mu\text{g/mL}$ , y observaron cómo, para una de las cepas, la acción de la lisostafina en concentración 0,4  $\mu\text{g/mL}$  conseguía deshacer más del 50 % del biofilm formado. [61] Aunque no se pueden comparar los resultados cuantitativamente porque no se cumplen las mismas condiciones experimentales, los resultados de nuestro estudio van en la misma línea que los de los estudios mencionados, con MICs muy bajas para los cultivos planctónicos ( $\mu\text{g/mL}$ ) y mayores para los cultivos en biofilm debido al carácter protector del mismo.

## 4.2. Síntesis y caracterización de partículas PLGA-Lst

La síntesis de las partículas con lisostafina en su interior supuso un reto debido, principalmente, a dos factores: por una parte, nunca se había trabajado con esta proteína en el grupo de investigación y, por otra, la falta de referencias en la literatura sobre síntesis de partículas con lisostafina en su interior producidas por el método de emulsión doble. Por ello, desde el primer momento se intentó adaptar un método utilizado con anterioridad en el grupo de investigación, pero los problemas no tardaron en surgir. En la Tabla 2 se muestra un resumen de las pruebas realizadas (ver Anexo II) donde se refleja también la cronología de esta parte del trabajo:

**Tabla 2:** Resumen de las pruebas de síntesis realizadas hasta llegar al protocolo final.

Cronología	Emulsión	Cantidad proteína	Dte proteína	Problema encontrado (ver Anexo)
Nov	Doble	15 ug	Buffer	Cantidad de proteína insuficiente; imposible cuantificación
Nov	Doble	100 ug	Buffer	Turbidez, no es posible caracterizarlas por DLS
Dic	Doble, doble* y sencilla	100 ug	Buffer	Aparecen precipitados en todas; la sencilla parece salir mejor pero la caracterización completa no es posible
Dic	Sencilla	100 ug	Buffer	Aparecen precipitados y resulta imposible la cuantificación de la proteína (resultados incoherentes)
Se observan las partículas formadas en el SEM. Parece ser que, aunque aparecen precipitados, en la emulsión doble* se forman partículas de forma correcta. Se plantea la hipótesis de que los precipitados podrían ser a causa de un exceso de concentración de partículas en la síntesis, o de problemas de rendimiento.				
Dic-Ene	Doble*; pruebas optimización	-	Buffer	Se analizan partículas y sobrenadantes utilizando dos centrífugas diferentes y distintas condiciones, pero las partículas al SEM son muy irregulares y polidispersas. Finalmente se decide mantener el protocolo inicial.
En este punto existen dos problemas: por una parte, la restricción en cuanto a la cantidad de proteína (100 ug es la carga máxima en la fase acuosa) implica que no sea posible cuantificarla al final de la síntesis. Por otro lado, la explicación de que la síntesis no salga de manera correcta, sin precipitados, puede deberse a la presencia del buffer ácido. Se recurre a la literatura y se realizan pruebas con otro disolvente para la proteína.				
Feb	Doble*; pruebas sin péptido	-	PBS	Las partículas se forman de manera correcta y es posible caracterizarlas por DLS y SEM
Ante los resultados obtenidos con el PBS como disolvente de la proteína (tanto en la síntesis de las NPs como al enfrentarlo con bacterias) se decide adquirir un nuevo lote de proteína. Este es redispersado en PBS y a una concentración mayor (10 mg/mL) que la del lote inicial.				
Mar-Abr	Doble* y sencilla	400 ug	PBS	En la síntesis doble aparece precipitado en aquellas que contienen proteína. La caracterización se realiza dejando sedimentar la muestra. Sólo es posible la cuantificación de la proteína encapsulada de manera indirecta. El resultado de la síntesis sencilla es una suspensión lechosa que no se puede caracterizar.
Se observan las partículas al SEM y se decide que la emulsión doble* será la síntesis final.				

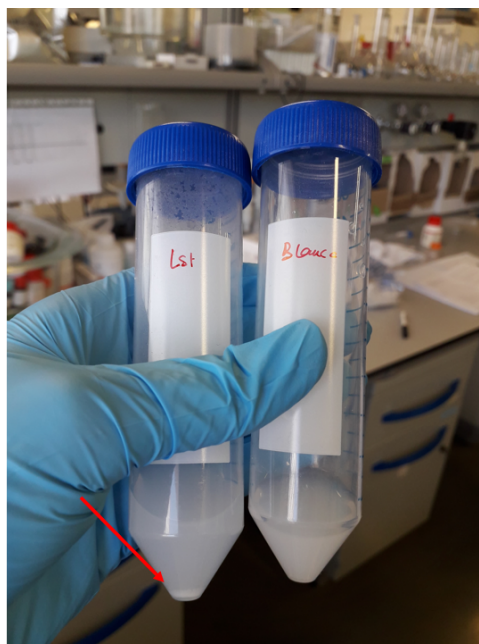
\*Emulsión doble con mayor fase acuosa

El protocolo final, por tanto, comprendía la formación de partículas por el método de emulsión doble W/O/W, como se explicó en la sección 3.3 de la memoria. A continuación se muestran los resultados de la caracterización de las partículas sintetizadas en base a este método.

La aparición de precipitados en aquellas muestras con lisostafina supuso un problema constante en la caracterización de las mismas y, en algunos casos, resultaba incompleta. Para obtener los datos de caracterización de la Tabla 3 fue necesario dejar que las muestras con proteína sedimentasen lo máximo posible antes de analizarlas. En un primer momento se pensó que la



aparición de precipitados (Fig. 8) era debida a que las partículas no se llegaban a formar. Sin embargo, esta razón perdió peso al ver las imágenes de SEM. En ellas, las partículas sí que se veían formadas, aunque con diferencias evidentes respecto al control. Los precipitados podrían atribuirse quizás a restos de polímero derivados de una interacción entre la proteína y algún componente de la síntesis, lo que provocaría también rendimientos de reacción más bajos (como se observa en la Tabla 3).



**Figura 8:** Fotografía de las muestras de partículas con lisostafina (izda) y control (dcha) re-dispersadas una vez finalizada la síntesis. La flecha indica la formación de precipitados en la muestra con proteína.

**Tabla 3:** Resumen de los datos de caracterización de todas las muestras tras la síntesis.

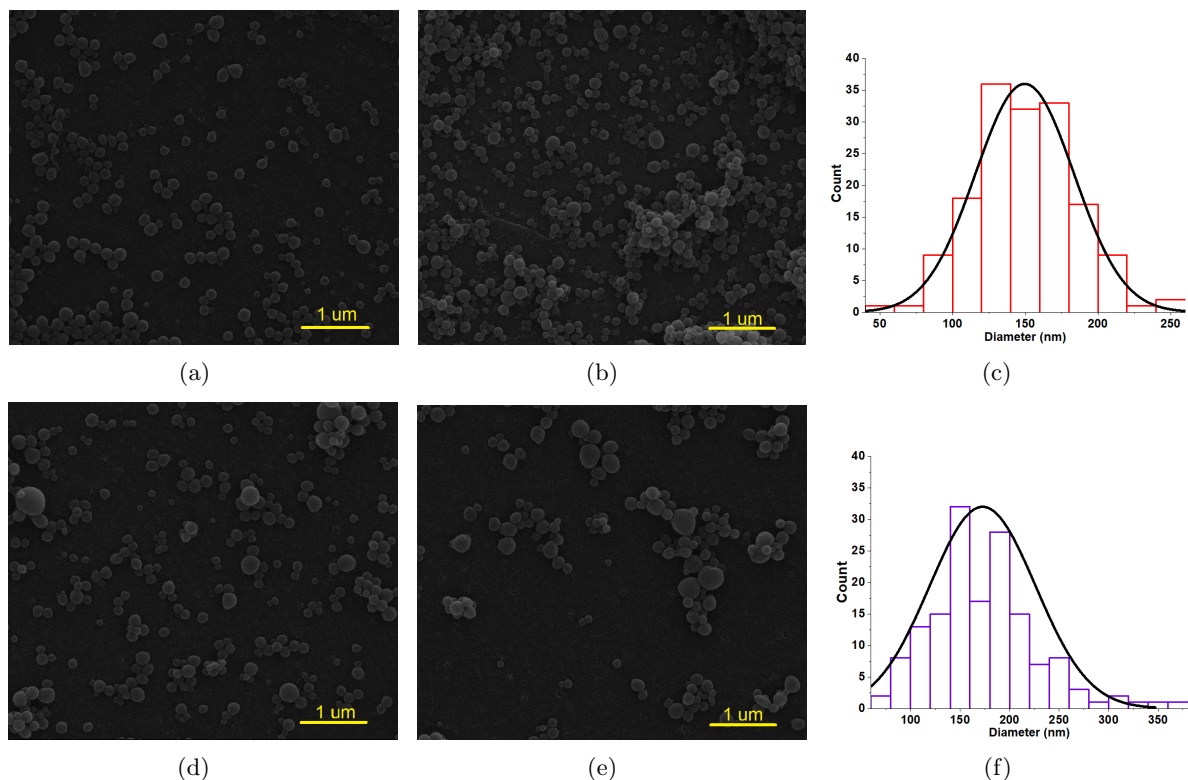
Muestra	C (mg/mL)	R (%)	Z pot. (mV)	Eff. Diam (nm)	PDI
Control	$4,0 \pm 1,7$	$30,6 \pm 5,4$	$-47,1 \pm 0,7$	$196,7 \pm 85,2$	$0,121 \pm 0,013$
Lst	$2,2 \pm 0,5$	$22,2 \pm 3,5$	$-48,8 \pm 0,6$	$285,9 \pm 111,6$	$0,176 \pm 0,022$

C: concentración; R: rendimiento de reacción; Z pot: potencial zeta; Eff. Diam: diámetro hidrodinámico; PDI: índice de polidispersidad

En cuanto a los datos de potencial Z, que da idea de la carga superficial de las partículas en el medio, tanto la síntesis control como aquella con lisostafina muestran valores similares. Por el contrario, tanto el tamaño hidrodinámico como el índice de polidispersidad resultan en valores más altos para la síntesis que contenía lisostafina.

En la siguiente figura (Fig. 9) se muestran, a modo de ejemplo, algunas de las imágenes obtenidas por microscopía SEM correspondientes a una muestra de síntesis control (sin lisostafina) y otra con proteína. También se expone el histograma de tamaños de partícula asociados a esas y otras imágenes de las mismas muestras. En el anexo se pueden consultar más imágenes de otras síntesis realizadas.





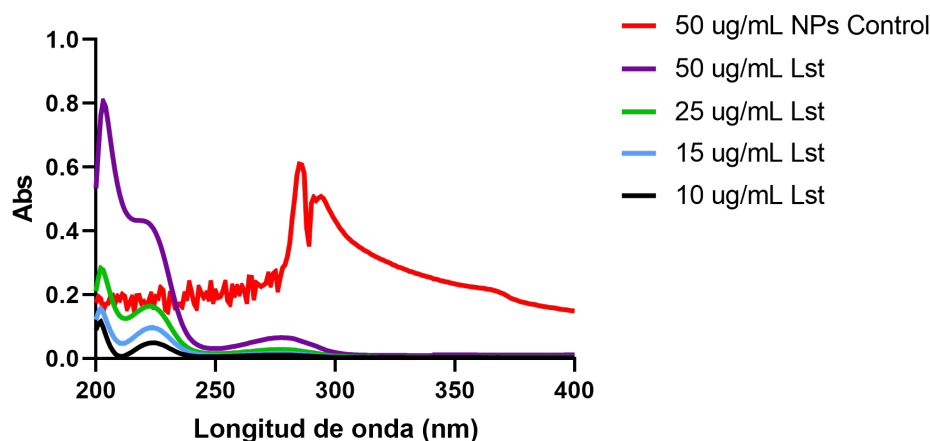
**Figura 9:** Imágenes de SEM (50000x) e histogramas de tamaño asociados de las partículas (control (a, b y c) y con proteína (d, e, f)) sintetizadas.

Para las distribuciones de tamaño de esas muestras, el tamaño medio ( $N=150$ ) de las partículas control fue de  $149,6 \pm 33,9$  nm, mientras que el de la muestra con lisostafina fue de  $172,7 \pm 53,6$  nm.

Como se ha mencionado, las imágenes muestran diferencias entre las partículas control y aquellas con proteína. Estas diferencias son tanto morfológicas (aquellas con la proteína pierden esfericidad, son algo más irregulares) como de tamaño y polidispersidad de las muestras. Así, en las síntesis que contenía lisostafina se observa una mayor variación de tamaños, con partículas de más de 300 nm de diámetro. En general, estos datos concuerdan cualitativamente con los mostrados en la Tabla 3.

### 4.3. Determinación de la cantidad de proteína encapsulada

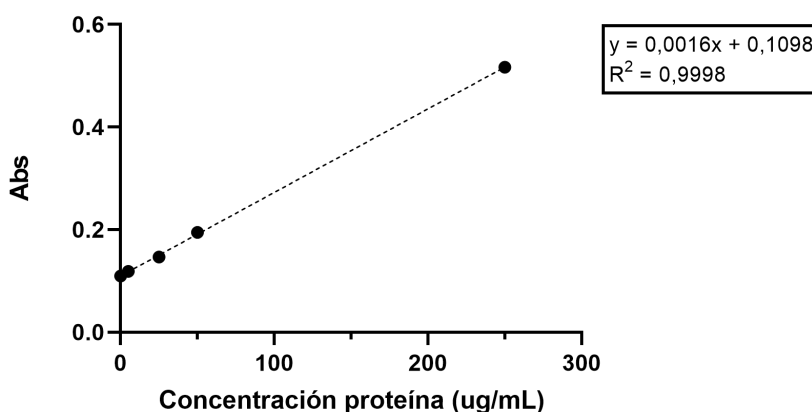
La cuantificación de la proteína en las partículas tampoco resultó sencilla ya que se partía de una masa total de proteína adicionada a la síntesis muy baja. Ello se debía, principalmente, a su alto coste, y al hecho de que ya se había determinado una alta actividad bactericida para la proteína libre a bajas concentraciones. En primera instancia, se quiso utilizar la técnica de espectroscopía de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis). Para ello, se realizó un espectro de absorción a diferentes concentraciones de lisostafina con el fin de poder realizar una recta de calibrado que relacionase la concentración de proteína en la muestra con la absorbancia de la misma. La siguiente figura muestra el espectro de absorción obtenido:



**Figura 10:** Espectro absorción de la lisostafina a diferentes concentraciones. También se muestra la absorción de una muestra de partículas sin la proteína (NPs control).

Como muchas otras proteínas, la lisostafina muestra un pico característico a 280 nm (presencia de aminoácidos aromáticos) y también a 200 nm (enlace peptídico). Ambos pueden estar ligeramente desplazados debido a la polaridad del disolvente. [62] Se observa que a bajas concentraciones la señal es mínima (0,1 para la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ ). De hecho, también se intentó determinar para concentraciones menores de proteína pero no fue posible. Asimismo, en la misma región donde aparecen los picos de absorbancia de la proteína también absorben otros componentes orgánicos de la síntesis, como el polímero, como se observa en el espectro correspondiente a la dispersión de partículas control. Por todo esto, fue necesario utilizar otro método que permitiese cuantificar la proteína tras el proceso de síntesis.

Alternativamente se utilizó un *kit* rápido específico para la detección de proteínas (ensayo de la BCA; ver Anexo III). Con él es posible interpolar la señal obtenida al analizar las muestras en una recta de calibrado de la proteína modelo (BSA) y así obtener la concentración de la proteína en las muestras analizadas. La Fig. 11 muestra a modo de ejemplo la recta de calibrado obtenida con el *kit*:



**Figura 11:** Recta de calibrado de BSA utilizada para determinar la concentración de lisostafina presente en las muestras.

Para el análisis de las muestras, primero se analizaron los sobrenadantes (cuantificación

indirecta por diferencia con respecto a la cantidad de proteína adicionada inicialmente). En todos los casos, la absorbancia de las muestras se encontraba en torno al segundo punto de la recta de calibrado ( $5 \mu\text{g/mL}$ ) y, por tanto, la señal de absorbancia obtenida era muy baja y cercana al cero. La cantidad de lisostafina añadida a la síntesis en el protocolo final fue de  $400 \mu\text{g}$ . El análisis promedio de todas las muestras de sobrenadantes analizadas dio como resultado una cantidad de proteína determinada de  $362,7 \pm 49,5 \mu\text{g}$ . Se intentó también determinar directamente la cantidad de la proteína en el interior de las partículas pero esto no fue posible debido al límite de detección del *kit* de BCA (la concentración era menor de lo que se podía detectar).

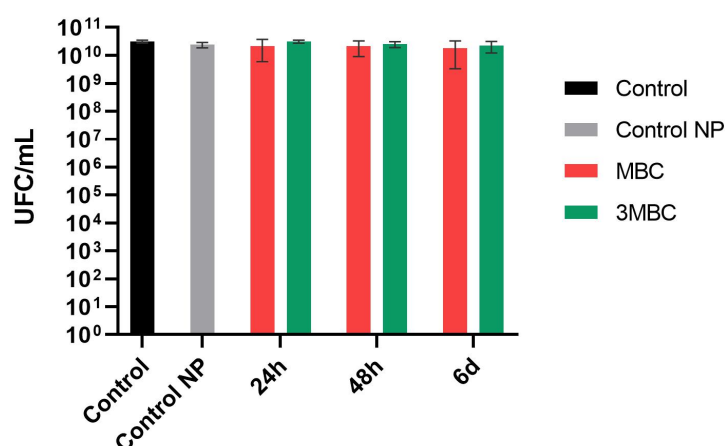
#### 4.4. Actividad antimicrobiana de los sistemas particulados

Debido a la imposibilidad de cuantificar directamente el perfil de liberación de la proteína en el tiempo, se decidió llevar a cabo un experimento alternativo para tratar de estimar cómo se lleva a cabo la liberación. Para ello, se realizaron varias síntesis de partículas PLGA-Lst, cuyos datos de Eficiencia de Encapsulación y Drug Loading pueden consultarse en la Tabla 4.

**Tabla 4:** Datos de eficiencia de encapsulación (EE) y drug loading (DL) de las tres síntesis realizadas para el experimento de liberación. Ambos fueron determinados de manera indirecta.

Muestra	EE (%)	DL(%)
Lst_1	1,5	0,1
Lst_2	12,0	0,5
Lst_3	9,4	0,2

Atendiendo a estos resultados, se calcularon los volúmenes de medio de liberación necesarios para enfrentar a las bacterias a la concentración de MBC y 3MBC del cultivo planctónico. Es decir, si se tiene en cuenta la cantidad de proteína encapsulada en cada síntesis (DL), y la hipótesis de que el 100 % de lo encapsulado se habría liberado a las 24h resultaba cierta, las bacterias se sometieron a concentraciones de  $0,75$  y  $2,25 \mu\text{g/mL}$  de proteína (MBC y 3MBC de la proteína libre para *S. aureus* Newman en el cultivo planctónico). Los resultados de este experimento se muestran en la siguiente figura.



**Figura 12:** Resultado del experimento consistente en enfrentar *S. aureus* Newman con lo liberado por las partículas. Se muestran como UFC/mL media  $\pm$  SD (N=12). No se encontraron diferencias significativas con respecto a la media control ( $p > 0,05$ ).

Además del control de bacterias, se realizó también un control con lo liberado por partículas control durante 6 días (en la gráfica, *Control NP*), es decir, partículas que no contenían proteína. No se observan diferencias significativas entre ambos controles, lo que confirma que los productos de degradación del PLGA no afectan al crecimiento bacteriano.

Los resultados representados en la Fig. 12 muestran además que no ocurre una reducción en la viabilidad celular para ninguno de los tiempos de liberación y concentraciones probadas. Estos datos nos llevan a pensar que durante la síntesis de las partículas, la proteína podría haber perdido su potencial bactericida, fruto de una degradación de la misma en algún paso de la síntesis. También podría darse el caso de que las partículas no contuviesen proteína en su interior, es decir, que en ningún momento se hubiera encapsulado. Los argumentos que sostienen esta suposición son varios. Por un lado, en el caso probable de que el 100 % de la liberación no hubiera ocurrido a las 24h, sí que cabría esperar la liberación de la mayor parte del compuesto encapsulado tras 6 días. Además, ni siquiera para una concentración que triplica la concentración de lisostafina libre necesaria para eliminar todas las bacterias en el cultivo planctónico se observa una leve reducción del crecimiento bacteriano para ninguno de los casos. Asimismo, no hay que olvidar que en todos los casos la cantidad de proteína encapsulada fue determinada de manera indirecta, analizando los sobrenadantes de la síntesis y no las partículas, y que, en cualquier caso, lo que se habría encapsulado en toda la síntesis es una cantidad muy pequeña. Podría ser que la cantidad encapsulada, que la definíamos como la diferencia entre lo adicionado al comienzo de la síntesis y lo determinado en el sobrenadante final, no se encuentre en realidad dentro de las partículas, sino que se haya perdido con los sucesivos lavados o en los precipitados encontrados en aquellas síntesis que contenían la proteína.

Cabe, pues, preguntarse cuál es el motivo por el cual la síntesis no ha sido lograda con éxito. Parece ser que la aparición de agregados o precipitados es el resultado de la pérdida de estabilidad de las proteínas, y resulta ser uno de los inconvenientes más frecuentes en el desarrollo de tratamientos farmacológicos que incluyan estos compuestos. No sólo serían inactivos desde el punto de vista terapéutico, sino que además, la mera presencia de estos agregados aún en pequeñas cantidades puede causar reacciones inmunológicas adversas y suponer un riesgo para el paciente. Este problema puede surgir tanto durante la síntesis de los compuestos como en la liberación de la proteína al medio exterior. En él pueden influir factores como el pH, la temperatura o los iones presentes. [63] En nuestro caso, la inestabilidad de la proteína podría aparecer durante el proceso de síntesis de las partículas, bien al cargar la proteína o bien al formar las partículas finales [64], y sería, entonces, inherente al método utilizado (emulsión).

El motivo más habitual de la inestabilidad proteica surgida en los procesos de emulsión recae en la formación de la interfaz acuosa-orgánica. [65–69] Las proteínas son cadenas de distintos aminoácidos unidas entre sí por enlaces peptídicos. Generalmente, en la estructura terciaria (esto es, tridimensional) de las proteínas, los aminoácidos hidrofílicos (con afinidad por el entorno acuoso) se encuentran en el exterior, mientras que aquellos hidrofóbicos quedan orientados hacia el interior. Al poner en contacto los disolventes orgánico y acuoso las proteínas tienden a quedarse adsorbidas justo en la interfaz entre ambas fases y su conformación estructural cambia. De este modo, aquellos aminoácidos que antes se encontraban en el interior de la proteína, ahora se encuentran orientados hacia la fase orgánica, por la que tienen afinidad. Algo similar ocurre con los residuos hidrofílicos y la fase acuosa. Así, la proteína, que ha cambiado su estructura, se encuentra ahora desplegada (*desnaturalizada*). [70] La acumulación de moléculas de proteína que se encuentran total o parcialmente desplegadas hace que cada vez sea más difícil volver a la estructura inicial (se impide el plegamiento) y se forman agregados de proteínas unidas entre sí que precipitan. Este proceso es irreversible en la mayoría de los casos. Además de la adsorción y despliegue de las proteínas, otro factor del proceso de emulsión que puede afectar a la estabi-

lidad proteica es el grado de fuerza aplicado para formar la emulsión. Por ejemplo, la aplicación de la fuerza mediante sonicación genera burbujas de gas que colisionan con las moléculas de la disolución con mucha energía. Esto provoca que se formen entornos con altas temperaturas muy localizados. Con el aumento de la temperatura, las proteínas presentes son más propensas a desnaturalizarse y precipitar. [71].

Aunque estos han sido algunos de los motivos más reportados como causantes de fallos en la síntesis de partículas cargadas con proteínas, no tendría sentido achacar el fallo de nuestra síntesis a una causa en concreto, puesto que no se han realizado las pruebas suficientes para ello. Hay que tener en cuenta que en toda la síntesis hay multitud de variables que pueden afectar. La concentración de proteína en la fase acuosa, el volumen de la fase orgánica o incluso la velocidad a la que se ponen en contacto ambas fases también pueden influir en la estabilidad de la proteína. [72] Nos limitaremos a decir que lo más probable es que factores inherentes a la síntesis hayan degradado la proteína y, debido a ello, los sistemas sintetizados no muestran actividad bactericida en las condiciones probadas.

## 5. Conclusiones

A continuación se exponen las conclusiones derivadas de los resultados discutidos anteriormente. En cuanto a los objetivos específicos del trabajo:

- Se ha evidenciado un carácter bactericida de la proteína muy potente en los experimentos con lisostafina libre, hechos que concuerdan con los expuestos en la literatura.
- En las circunstancias del estudio, la lisostafina ha demostrado ser igual de eficaz para matar cepas ya sensibles a la meticilina (Newman) o incluso resistentes a ella (USA300), lo que la convierte en una terapia alternativa prometedora para el tratamiento de infecciones mediadas por bacterias resistentes respecto a los antibióticos convencionales.
- La lisostafina ha conseguido prevenir la formación del biofilm para las tres cepas bacterianas en las condiciones probadas, lo que conduce a pensar que su uso podría ser especialmente beneficioso para el tratamiento de infecciones crónicas de la piel, donde la prevalencia de estos biofilms es muy alta. Asimismo, su uso podría extenderse a los recubrimientos de materiales como prótesis o implantes, donde aparecen biofilms con facilidad.
- El biofilm formado dota de una protección muy fuerte frente a la actividad antimicrobiana de la proteína, lo que impide que la proteína lo elimine aún encontrándose en concentraciones muy altas.
- Se desconoce si la pérdida de la actividad bactericida en los sistemas particulados sintetizados se debe a una degradación de la proteína en las condiciones de síntesis o a la no encapsulación de la misma.
- El método utilizado con las condiciones probadas no ha resultado ser útil para la síntesis de sistemas poliméricos de liberación sostenida de lisostafina.

En cuanto a los objetivos académicos del trabajo:

- Se ha estudiado y comprendido el problema de las infecciones crónicas de piel y cómo de necesaria es la búsqueda de nuevas alternativas a los antibióticos para evitar el problema de la adquisición de resistencias.
- Se ha aprendido a trabajar en laboratorios microbiológicos y se ha complementado con el trabajo de síntesis y caracterización de sistemas nanoestructurados, donde se han visto aplicados los conocimientos adquiridos durante la especialidad de Biomateriales Avanzados. De esta manera, se ha visto evidenciado el carácter multidisciplinar del máster.

- Aunque los resultados no han sido los deseados, se ha desempeñado un trabajo experimental exhaustivo, donde se han afrontado nuevos retos y se ha aprendido a lidiar con la frustración derivada de la investigación.

## 6. Líneas futuras

En cuanto a la continuación del presente trabajo, es necesario tener en cuenta las limitaciones con las que nos hemos encontrado. En la línea de comprobar si la lisostafina se encuentra degradada en el interior o fuera de las partículas, se llevará a cabo una técnica de caracterización estructural de la misma (por ejemplo, por dicroísmo circular o por la técnica de western blot) para las muestras y sobrenadantes. Asimismo, con el objetivo de aumentar la sensibilidad en la determinación la cantidad de proteína presente en las muestras, éstas se pueden analizar mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Si no se dispone del equipo, también se puede marcar la proteína, por ejemplo con un radioisótopo o con una sonda fluorescente. Asimismo, se puede probar a sintetizar los sistemas particulados mediante otros métodos, como aquellos que incluyen dispositivos microfluídicos.

## Referencias

- [1] A.J. Singer and R. Clark. Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*, 341(10):738–746, 1999.
- [2] C. Sen, editor. *MicroRNA in Regenerative Medicine*, chapter 24: Skin wound healing, pages 632–633. Academic Press, Elsevier, 2015.
- [3] G. Han and R. Ceilley. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. *Advances in therapy*, 34(3):599–610, 2017.
- [4] M.C. Robson et al. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current problems in surgery*, 2(38):72–140, 2001.
- [5] T. Velnar et al. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of international medical research*, 37(5):1528–1542, 2009.
- [6] T.J. Shaw and P. Martin. Wound repair at a glance. *Journal of cell science*, 122(18):3209–3213, 2009.
- [7] S. Enoch and D.J. Leaper. Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 26(2):31–37, 2008.
- [8] J. Hart. Inflammation 1: its role in the healing of acute wounds. *Journal of wound care*, 11(6):205–209, 2002.
- [9] M. B. Witte and A. Barbul. General principles of wound healing. *Surgical clinics of North America*, 77(3):509–528, 1997.
- [10] F. Gottrup. A specialized wound-healing center concept: importance of a multidisciplinary department structure and surgical treatment facilities in the treatment of chronic wounds. *The american journal of surgery*, 187(5):S38–S43, 2004.
- [11] W.K. Stadelmann et al. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *The American journal of surgery*, 176(2):26S–38S, 1998.
- [12] N.J. Percival. Classification of wounds and their management. *Surgery (Oxford)*, 20(5):114–117, 2002.
- [13] C. Sen et al. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound repair and regeneration*, 17(6):763–771, 2009.
- [14] A.R. Siddiqui and J.M. Bernstein. Chronic wound infection: facts and controversies. *Clinics in dermatology*, 28(5):519–526, 2010.
- [15] J. Posnett et al. The resource impact of wounds on health-care providers in europe. *Journal of wound care*, 18(4):154–154, 2009.
- [16] J.M. Smiell et al. Efficacy and safety of becaplermin (recombinant human platelet-derived growth factor-bb) in patients with nonhealing, lower extremity diabetic ulcers: a combined analysis of four randomized studies. *Wound repair and regeneration*, 7(5):335–346, 1999.
- [17] V.R. Driver et al. A clinical trial of Integra template for diabetic foot ulcer treatment. *Wound repair and regeneration*, 23(6):891–900, 2015.
- [18] A. Veves et al. Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. *Diabetes care*, 24(2):290–295, 2001.

- [19] W. A. Marston et al. The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. *Diabetes care*, 26(6):1701–1705, 2003.
- [20] S. Hamdan et al. Nanotechnology-driven therapeutic interventions in wound healing: potential uses and applications. *ACS central science*, 3(3):163–175, 2017.
- [21] S.J. Landis. Chronic wound infection and antimicrobial use. *Advances in skin & wound care*, 21(11):531–540, 2008.
- [22] K. Gjødtsbøl et al. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *International wound journal*, 3(3):225–231, 2006.
- [23] S. Malic et al. Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization (pna fish). *Microbiology*, 155(8):2603–2611, 2009.
- [24] G.A. James et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound repair and regeneration*, 16(1):37–44, 2008.
- [25] R. Serra et al. Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert review of anti-infective therapy*, 13(5):605–613, 2015.
- [26] D. Balasubramanian et al. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. *Pathogens and disease*, 75(1):ftx005, 2017.
- [27] V.G. Fowler Jr et al. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *New England journal of medicine*, 355(7):653–665, 2006.
- [28] M. Otto. Staphylococcal biofilms. *Bacterial biofilms*, pages 207–228, 2008.
- [29] S.P. Bebeko et al. Effect of a preoperative decontamination protocol on surgical site infections in patients undergoing elective orthopedic surgery with hardware implantation. *JAMA surgery*, 150(5):390–395, 2015.
- [30] S. Hogan et al. Current and future approaches to the prevention and treatment of staphylococcal medical device-related infections. *Current pharmaceutical design*, 21(1):100–113, 2015.
- [31] World Health Organization (WHO). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>, 2017. [Online; accessed June 4th, 2021].
- [32] M. Berlanga and R. Guerrero. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microbial cell factories*, 15(1):165, 2016.
- [33] N. Beyth et al. Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2015.
- [34] M. Malone et al. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *Journal of wound care*, 26(1):20–25, 2017.
- [35] S. Roy et al. *Staphylococcus aureus* biofilm infection compromises wound healing by causing deficiencies in granulation tissue collagen. *Annals of surgery*, 271(6):1174–1185, 2018.
- [36] M. Zasloff. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870):389–395, 2002.



- [37] T. Nakatsuji and R.L. Gallo. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *Journal of investigative dermatology*, 132(3):887–895, 2012.
- [38] C.A. Roque-Borda. Challenge in the discovery of new drugs: Antimicrobial peptides against WHO-List of critical and high-priority bacteria. *Pharmaceutics*, 13(6):773, 2021.
- [39] W.C. Wimley. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chemical biology*, 5(10):905–917, 2010.
- [40] R.K. Thapa et al. Topical antimicrobial peptide formulations for wound healing: Current developments and future prospects. *Acta biomaterialia*, 103:52–67, 2020.
- [41] H.N. Huang et al. Antimicrobial peptide epinecidin-1 promotes complete skin regeneration of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-infected burn wounds in a swine model. *Oncotarget*, 8(13):21067, 2017.
- [42] H. Liu et al. A short peptide from frog skin accelerates diabetic wound healing. *The FEBS journal*, 281(20):4633–4643, 2014.
- [43] R.P. Samy et al. Wound healing activity and mechanisms of action of an antibacterial protein from the venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *PLoS one*, 9(2):e80199, 2014.
- [44] A. Rai et al. One-step synthesis of high-density peptide-conjugated gold nanoparticles with antimicrobial efficacy in a systemic infection model. *Biomaterials*, 85:99–110, 2016.
- [45] A. P. Desbois et al. In vivo efficacy of the antimicrobial peptide ranalexin in combination with the endopeptidase lysostaphin against wound and systemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. *International journal of antimicrobial agents*, 35(6):559–565, 2010.
- [46] J.F. Kokai-Kun et al. Lysostaphin cream eradicates *Staphylococcus aureus* nasal colonization in a cotton rat model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(5):1589–1597, 2003.
- [47] J.F. Kokai-Kun et al. Lysostaphin eradicates established *Staphylococcus aureus* biofilms in jugular vein catheterized mice. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 64(1):94–100, 2009.
- [48] J. Polak et al. In vitro activity of recombinant lysostaphin-antibiotic combinations toward methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 17(4):265–270, 1993.
- [49] M. Climo et al. Mechanism and suppression of lysostaphin resistance in oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(5):1431, 2001.
- [50] J. Miao. Lysostaphin-functionalized cellulose fibers with antistaphylococcal activity for wound healing applications. *Biomaterials*, 32(36):9557–9567, 2011.
- [51] C. Windolf et al. Lysostaphin-coated titan-implants preventing localized osteitis by *Staphylococcus aureus* in a mouse model. *PLoS One*, 9(12):e115940, 2014.
- [52] M.E. Brown. *Development of a moldable composite bone graft substitute releasing antibacterial and osteogenic drugs*. PhD thesis, University of Kentucky, 2014.
- [53] B.F. King et al. Facile penetration of the *Staphylococcus aureus* capsule by lysostaphin. *Infection and immunity*, 29(3):892–896, 1980.

- [54] M. Bastos et al. Lysostaphin: a staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications. *Pharmaceuticals*, 3(4):1139–1161, 2010.
- [55] Asociación Española de Normalización y Certificación AENOR. (2021). UNE-EN ISO 20776-1:2021: Ensayo de susceptibilidad de agentes infecciosos y evaluación del funcionamiento de los dispositivos de ensayo de susceptibilidad antimicrobiana. Technical report.
- [56] S. García-Salinas et al. Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of different components of natural origin present in essential oils. *Molecules*, 23(6):1399, 2018.
- [57] E. Luque-Michel et al. A simple approach to obtain hybrid au-loaded polymeric nanoparticles with a tunable metal load. *Nanoscale*, 8(12):6495–6506, 2016.
- [58] P.K. Smith et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1):76–85, 1985.
- [59] E. Walencka et al. Lysostaphin as a potential therapeutic agent for staphylococcal biofilm eradication. *Polish journal of microbiology*, 54(3):191–200, 2005.
- [60] J. Wu et al. Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(11):3407–3414, 2003.
- [61] H. Ceotto-Vigoder et al. Nisin and lysostaphin activity against preformed biofilm of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Journal of applied microbiology*, 121(1):101–114, 2016.
- [62] F.X. Schmid. Biological macromolecules: UV-visible spectrophotometry. *eLS*, 2001.
- [63] J.L. Cleland et al. The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 10(4):307–377, 1993.
- [64] M. van de Weert et al. Protein instability in poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles. *Pharmaceutical research*, 17(10):1159–1167, 2000.
- [65] H. Sah. Protein behavior at the water/methylene chloride interface. *Journal of pharmaceutical sciences*, 88(12):1320–1325, 1999.
- [66] J. L. Cleland and A.J. Jones. Stable formulations of recombinant human growth hormone and interferon- $\gamma$  for microencapsulation in biodegradable microspheres. *Pharmaceutical research*, 13(10):1464–1475, 1996.
- [67] H.K. Kim and T.G. Park. Microencapsulation of human growth hormone within biodegradable polyester microspheres: protein aggregation stability and incomplete release mechanism. *Biotechnology and bioengineering*, 65(6):659–667, 1999.
- [68] M. van de Weert et al. Protein instability in poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles. *Pharmaceutical research*, 17(10):1159–1167, 2000.
- [69] S. Mohammadi-Samani and B. Taghipour. PLGA micro and nanoparticles in delivery of peptides and proteins; problems and approaches. *Pharmaceutical development and technology*, 20(4):385–393, 2015.
- [70] R.A. Latour. Fundamental principles of the thermodynamics and kinetics of protein adsorption to material surfaces. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 191:110992, 2020.

- [71] M. Morlock et al. Microencapsulation of rh-erythropoietin, using biodegradable poly (d,l-lactide-co-glycolide): protein stability and the effects of stabilizing excipients. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 43(1):29–36, 1997.
- [72] V. Saez et al. Microspheres as delivery systems for the controlled release of peptides and proteins. *Biotechnología aplicada*, 24(2):108–116, 2007.